

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ
ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ
НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ФАКТОРА *IN VITRO* И *IN VIVO***

**И.В. Пухтеева¹, Н.В. Герасимович¹, Н.В. Прокопенко¹,
М.Л. Левин², Е.А. Лосицкий³**

¹Международный государственный экологический университет имени А.Д. Сахарова, Беларусь,
puhteeva@mail.ru

²Институт тепло– и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси

³Республиканский Центр спортивной медицины, Беларусь

Введение. Изучение механизмов индивидуальной устойчивости организма к неблагоприятному действию различных физических факторов имеет большое социальное и медицинское значение.

Действие низких температур на биологические объекты проявляет много общих закономерностей, в основе которых лежит действие холода на жизнь в широком понимании этого слова. Однако установлено, что различные представители животного и растительного мира, различные органы, ткани и клетки могут по–разному реагировать на действие холода [1].

Показано, что при низкотемпературном воздействии активность отдельных ферментативных систем изменяется по–разному, так как каждая система тормозится при достижении своего температурного порога активности. При этом происходит нарушение регуляции обменных процессов и накопление продуктов обмена [2].

Установлено, что использование метода криотерапии способствует повышению уровня работоспособности и адаптационных возможностей спортсменов и в целом организма любого человека. Эти проблемы на сегодняшний день являются актуальными и требуют дальнейшей более детальной теоретической и практической разработки [3].

На сегодняшний день особую актуальность приобретает поиск молекулярных маркеров адаптационного воздействия на организм различных экологических факторов. Нерешенными также остаются вопросы, связанные с раскрытием механизмов их действия на состояние клеток крови организма [4].

В связи с этим представляет особый интерес исследование влияния низких температур на физико–химическое состояние мембран различных популяций клеток в процессах адаптации организма к экстремальным условиям.

Материалы и методы. В первой серии экспериментов исследования проводили на крысах–самцах зрелого возраста (6 мес.), содержащихся на стандартном рационе питания вивария. Объектом исследования служили тимоциты, выделенные по стандартной методике [9]. Для оценки температурного воздействия *in vitro* суспензию тимоцитов объемом 1 мл, содержащую 10^6 клеток, помещали в стеклянную пробирку, измеряли контрольную температуру (до охлаждения) ртутным термометром, затем пробирки помещали в морозильную камеру на 5, 10, 15, 20 мин соответственно, создавая диапазон понижения температуры от 21°C до 1°C.

Объектом исследования *in vivo* являлись лимфоциты периферической крови доноров, подвергшихся воздействию криотерапии.

Число жизнеспособных клеток, определенное по тесту с трипановым синим (0,2 % раствор красителя) [9] составляло в контроле не менее 96 %.

Изучение структурного состояния мембран клеток проводили с помощью флуоресцентного зонда пирена. Структурное состояние мембран оценивали по интенсивности флуоресценции мембранных триптофанилов, эксимеризации пирена; полярности окружения зонда в области аннулярных липидов и липидном бислое [7].

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре SFL – 1211A ("Solar", Беларусь).

Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета статистических программ Microsoft Excel 2003. Результаты экспериментов выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки средней, достоверность различий в группах оценивали по t-критерию Стьюдента. При этом различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ [10].

Результаты и обсуждение. Для изучения структурного состояния мембран тимоцитов использовали флуоресцентный зонд пирен [7,8]. В возбужденном состоянии молекулы пирена способны объединяться в долгоживущие комплексы–эксимеры, испускание квантов у которых смещено в более длинноволновую область по сравнению с мономером. Эксимеризация является диффузионно–контролируемым процессом и может характеризовать микровязкость окружения зонда.

Измерение флуоресценции пирена при длинах волн возбуждения 286 нм и 337 нм позволяет учитывать гетерогенность липидной фазы. При возбуждении зонда светом с длиной волны 337 нм флуоресценция определяется суммарным вкладом пирена, локализованного как вблизи белка, так и в общей липидной фазе. При стимуляции флуоресценции квантами относительно низковолновой части спектра (286 нм), возникающая затем эмиссия определяется молекулами пирена, расположенными в приобластной области, так как формируется за счет безизлучательного переноса энергии на зонд с мембранных триптофанилов [7].

Анализ полученных результатов показал, что все регистрируемые показатели, характеризующие структурное состояние липидного компонента плазматических мембран тимоцитов, постепенно нарастали по мере снижения температуры.

Исходя из данных, представленных на рисунке 1 видно, что охлаждение суспензии тимоцитов приводило к увеличению микровязкости аннулярного липида в 1,2 раза в диапазоне температур от 21°C до 1°C. При этом показатель микровязкости аннулярного липида увеличился с $0,35 \pm 0,02$ в контроле до $0,46 \pm 0,4$ при охлаждении суспензии до 1°C ($p < 0,05$).

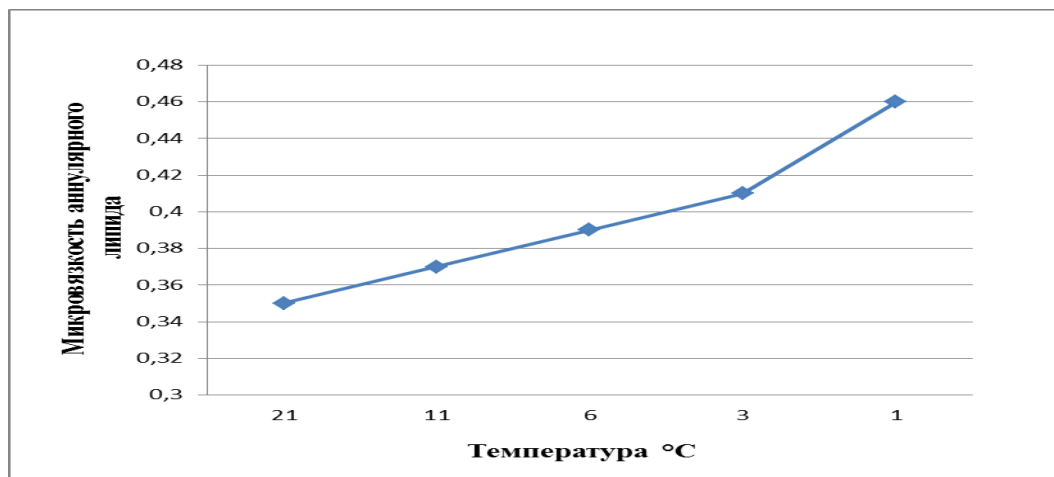


Рисунок 1 – Изменение микровязкости аннулярного липида мембран тимоцитов в диапазоне температур от 21°C до 1°C

Как видно из таблицы 1 показатели полярности аннулярного липида в контроле составили $0,65 \pm 0,01$ отн.ед. При снижении температуры в исследуемом диапазоне наблюдалось постепенное увеличение регистрируемых показателей примерно на 30%.

Аналогичная тенденция наблюдалась при изучении показателей полярности липидного бислоя.

Таблица 1 – Влияние низких температур на показатели полярности плазматических мембран тимоцитов крыс (отн.ед.)

Температура	Полярность аннулярного липида	Полярность липидного бислоя
Контроль 21° С	0,65 ± 0,01	0,64 ± 0,03
11° С	0,68 ± 0,03	0,66 ± 0,02
6° С	0,71 ± 0,03	0,68 ± 0,01
3° С	0,75 ± 0,02*	0,69 ± 0,02
1° С	0,77 ± 0,01*	0,70 ± 0,02

Примечание –* – различия достоверны при $p \leq 0,05$

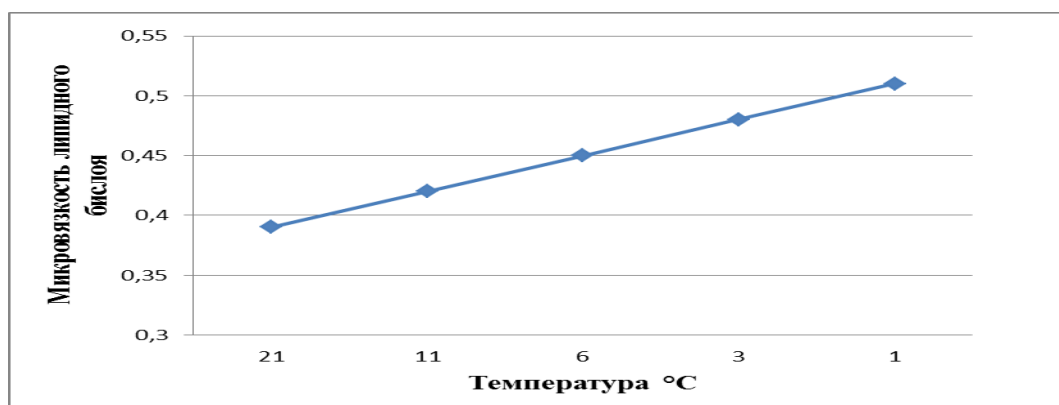


Рисунок 2 – Температурозависимое изменение микровязкости липидного бислоя

Микровязкость липидного бислоя на протяжении всего диапазона температур линейно увеличивалась по мере снижения температуры: в контроле ее значение равнялось $0,39 \pm 0,03$, при снижении температуры до 1°С она увеличилась примерно в 1,3 раза и составила $0,51 \pm 0,05$ ($p \leq 0,05$) (рис.2).

Исходя из полученных данных, можно предположить, что установленное при понижении температуры увеличение показателей микровязкости и полярности липидного компонента плазматической мембраны может быть связано с фазовым переходом липидов плазмалеммы из естественного жидкокристаллического состояния в гелеобразное, характеризующееся меньшей пластичностью [4, 5].

Анализ вышеизложенных результатов показал, что показатели, характеризующие состояние липидного компонента плазматических мембран тимоцитов, постепенно нарастали по мере снижения температуры. При оценке белкового компонента мембран отмечена такая же тенденция (табл. 2).

Таблица 2 – Изменение степени тушения белковой флуоресценции плазматических мембран тимоцитов крыс при действии низких температур

Температура	Степень тушения белковой флуоресценции, %
Контроль 21° С	24,15 ± 2,08
11° С	25,12 ± 2,06
6° С	25,68 ± 2,78
3° С	28,03 ± 2,53
1° С	28,41 ± 2,83

В наших экспериментах, снижение температуры в пределах положительных значений не вызвало достоверных изменений белок–липидных взаимодействий.

Полученные результаты дополняют имеющиеся экспериментальные данные об изменении структурного состояния мембраны, переходе ее из жидкокристаллического состояния в гелеобразное и изменении белок–липидного взаимодействия при действии низких температур [4,6].

Кроме того анализ выживаемости тимоцитов показал, что в исходной суспензии при температуре 21°C количество погибших клеток не превышало 1–3%, соответственно количество выживших клеток составляло около 97%, что входит в пределы нормы.

После охлаждения до температуры 1°C выживаемость уменьшалась примерно на 10% по сравнению с контролем. Причиной увеличения гибели клеток может быть повреждение структуры плазмалеммы, связанное с трансформацией липидного и белкового компонентов, результатом чего является нарушение барьерных, транспортных, защитных свойств мембраны, ведущее к гибели клетки.

Анализ полученных данных в экспериментах *in vivo* показал, что криотерапия выявляет противоположные тенденции, по сравнению с низкотемпературным воздействием в экспериментах *in vitro* (табл. 3).

Таблица 3 – Изменение полярности липидного компонента плазматических мембран лимфоцитов периферической крови доноров (отн.ед.)

Условия	Полярность аннулярного липида	Полярность липидного бислоя
До воздействия n = 6	0,76 ± 0,01	0,95 ± 0,06
После воздействия n = 8	0,73 ± 0,01	0,84 ± 0,05

Как видно из таблицы 3, показатели полярности аннулярного липида и липидного бислоя мембран лимфоцитов после криотерапии практически не изменялись, по сравнению со значениями до проведения низкотемпературного воздействия.

При исследовании микровязкости липидного компонента плазматических мембран лимфоцитов периферической крови отмечено достоверное снижение после криотерапии этого показателя в области аннулярных липидов более чем в 2,5 раза по сравнению с его величиной до воздействия (табл.4).

Таблица 4 – Влияние низкотемпературного воздействия на структурное состояние плазматических мембран лимфоцитов периферической крови доноров.

Показатель условия	Микровязкость, отн. ед.		Степень тушения триптофановой флуоресценции, %
	аннулярный липид	липидный бислой	
До воздействия n = 6	0,67 ± 0,15	0,70 ± 0,16	38,59 ± 4,28
После воздействия n = 8	0,25 ± 0,05 *	0,56 ± 0,08	25,37 ± 3,54*

Примечание – * – различия достоверны при $p \leq 0,05$

Кроме этого, отмечено уменьшение степени тушения триптофановой флуоресценции пиреном на 34% по сравнению со значениями до криовоздействия.

Таким образом, полученные данные *in vivo* позволяют предположить, что при кратковременном воздействии ультранизких температур на организм происходит общесистемное изменение функционирования стрессреализующих и адаптационных механизмов, вызывающее обратный эффект, по сравнению с

результатами, полученными в экспериментах *in vitro*.

Выводы. Криоповреждения мембран определяются действием различных физико–химических факторов, формирующихся в зоне действия низких температур. Основной мишенью криовоздействия является липидный компонент. При этом изменяется нормальное жидкокристаллическое состояние липидов, которое оказывает существенное влияние на структуру и функцию белков, липид–белковые взаимодействия. Результаты, полученные при проведении экспериментов *in vitro*, позволяют предположить, что следствием низкотемпературного воздействия на мембрану являет-

ся фазовый переход липидов из жидкокристаллического состояния в гелеобразное. Учитывая, что липиды, в частности фосфолипиды, участвуют в осуществлении энергетических, транспортных, защитных функций мембраны, то действие низких температур в условиях *in vitro*, может рассматриваться как причинный фактор повреждения плазматических мембран, приводящий к гибели клеток.

Предварительные исследования влияния криотерапии на структурно-функциональное состояние плазматических мембран лимфоцитов периферической крови человека (*in vivo*) позволяют предположить, что при кратковременном воздействии ультранизких температур происходят общесистемные изменения в организме, приводящие к адаптационному ответу.

Литература:

1. Белоус А.М., Грищенко В.И. Кробиология / А.М. Белоус. – Киев: Наукова думка, 1994. – 432 с.
2. Жмакин, А.И. Физические основы кробиологии / А.И. Жмакин // Успехи физических наук. – 2008. – Т.178 – № 3. – С.243 – 266.
3. Прохоров Г.Г. Достижения криомедицины / Г.Г. Прохоров // Материалы междунар. симп., Санкт–Петербург, 7 – 8 июня 2001г.
4. Лозинский Л.К. Очерки по кробиологии. Адаптации и устойчивость организма и клетки к низким и сверхнизким температурам / Л.К. Лозинский. – Л: Наука, 1972. – 288 с.
5. Панасенко О.О., Структура и свойства малых белков теплового шока / О.О. Панасенко, М.В. Ким, Н.Б. Гусев // Успехи биологической химии. – 2003. – Т.43. – С. 59 – 98.
6. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Биохимия мембран. Замораживание и криопротекция: учеб. пособие для биол. и мед. спец. вузов / под ред. А.А. Болдырева. – Москва: Высш. Шк., 1987. – 80 с.
7. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука – 1980. – 270с.
8. Векшин, Н.Л. К вопросу об измерении вязкости модельных и биологических мембран по люминесценции пирена / Н.Л. Векшин // Биол. Науки. – 1987. – № 11. – С. 59–66.
9. Лимфоциты: Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990. – 400 с.
10. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Высшэйшая школа, 1973. – 320 с.